**Wpływ różnych metod traktowania kultur na ekspresję
wirulencji i agresywności
*Phytophthora infestans***

**SYLWESTER SOBKOWIAK, EWA ZIMNOCH-GUZOWSKA,
HANNA ZARZYCKA**

Instytut Hodowli i Aklimatyzacji Roślin, Oddział w Młochowie, 05-831 Młochów
Sobkowiak S., Zimnoch-Guzowska E., Zarzycka H. (Plant Breeding and Acclimatization
Institute, Młochów Research Center, 05-831 Młochów, Poland)

Effect of various culture treatments on virulence and aggressiveness expression
of *Phytophthora infestans*

(Otrzymano: 20.06.2003)

Summary

The effect of experiment date, inoculum concentration and number of passages through potato tissue on virulence spectrum and aggressiveness level of four *Phytophthora infestans* isolates was examined in four tests. All these experimental variants significantly influenced the expression of virulence. Isolates chosen for study were characterized initially by complex virulence and high aggressiveness. The narrowest spectrum of virulence was noted at June and December in comparison with March and September. The inoculum concentration of 200 sporangia in 1 mm³ influenced stronger frequency of virulence factors, that concentration of 50 sporangia in 1 mm³. The cultures passaged many times showed the wider virulence spectrum than single or double passaged isolates. The double passages of pathogen cultures influenced stronger expression factors of virulence than single one. The significant interaction between experiment dates and number of passages and experiment dates and inoculum concentrations were observed. Higher inoculum concentration and more abundant passages on potato tissues positively affected detection of particular virulence factors, especially v5 and v8.

The cultures, both double and many times passaged on potato tuber slices, were significantly more aggressive in comparison with single passaged ones. The isolate MP 425 was the most stable in expression of its virulence and aggressiveness. The *P. infestans* cultures that lost infectivity on rye agar medium can recover their virulence and aggressiveness expression after double and frequent culturing on potato tissues.

Key words: experiment date, number of passages, inoculum concentration, interaction, *Phytophthora infestans*, pathogenicity to potato

WSTĘP

Dotychczasowe badania nad właściwościami pasożytniczymi *Phytophthora infestans* przeprowadzone w Instytucie Hodowli i Aklimatyzacji Roślin w Młochowie wykazały, że te same izolaty patogenu oceniane w różnych okresach roku mogą wykazywać różną ekspresję patogeniczności (Sujkowski, 1983; Sobkowiak i in., 2001). Niższą patogeniczność stwierdzono późną wiosną, a wysoką w sezonie letnim. Obniżeniu poziomu patogeniczności często towarzyszył spadek sporulacji, co bywało przyczyną trudności w uzyskaniu odpowiedniej koncentracji sporangiów w sporządzanej zawieszynie inokulacyjnej (Sujkowski, 1983). Do inokulacji materiałów hodowlanych w Młochowie używa się zawiesiny inokulacyjnej o standardowej koncentracji 50 sporangiów w 1 mm³. W okresach spadku patogeniczności próbowano poprawić poziom infekcyjności inokulum poprzez zwiększanie koncentracji sporangiów w zawieszynie inokulacyjnej. Pietkiewicz (1976b) i Zarzycka (1989) stwierdzili silniejsze porażenie inokulowanych listków ziemniaka po zastosowaniu zawiesiny o wyższej koncentracji. Jednak po przekroczeniu poziomu 200 sporangiów w 1 mm³ infekcyjność inokulum wyraźnie spadała. Przyczyną tego zjawiska były pogarszające się warunki tlenowe, które nie sprzyjały uwalnianiu się pływeczek ze sporangiów.

Izolaty *P. infestans* przeznaczone do oceny odporności materiałów hodowlanych ziemniaka i do badań przechowywane są standardowo w temperaturze 7°C na pożywce żytnio-agarowej pod olejem parafinowym. Kultury utrzymywane w ten sposób szybko obniżają swoje właściwości pasożytnicze i w celu ich odzyskania powinny zostać przeszczepione na tkanki ziemniaka (Zarzycka, 1996).

Celem badań, przeprowadzonych w 2002 roku było ustalenie wpływu terminu przeprowadzania testu, zastosowanej koncentracji inokulum, liczby pasażów na tkankach ziemniaka oraz wzajemnych zależności między tymi czynnikami na zmienność ekspresji wirulencji i agresywności izolatów *P. infestans* w stosunku do ziemniaka.

MATERIAŁ I METODY BADAŃ

W badaniach użyto cztery izolaty *P. infestans*, których charakterystyka została przedstawiona w tabeli 1. Izolaty te odznaczały się szerokim zakresem wirulencji (9-10 czynników) i wysokim poziomem agresywności (1-1,5 według skali 9-cio stopniowej). Ocenę zakresu wirulencji oraz poziomu agresywności przeprowadzono czterokrotnie:

- pod koniec zimy (w marcu),
- pod koniec wiosny (w czerwcu),
- pod koniec lata (we wrześniu),
- pod koniec jesieni (w grudniu).

Do inokulacji zastosowano izolaty *P. infestans* przechowywane w 7°C na żelnym agarze pod olejem parafinowym, które przed inokulacją były przepasazowane na plastrach z bulw ziemniaka odmiany Tarpan: jednorazowo, dwukrotnie lub wielokrotnie.

Tabela 1

Wstępna charakterystyka izolatów *P. infestans* użytych w doświadczeniu

Table 1

Initial characteristics of *P. infestans* isolates used in the experiment

Nr No	Nazwa izolatu Name of isolate	Rok izolacji Year of isolation	Zakres wirulencji Range of virulence	Poziom agresywności Level of aggressiveness	Typ kojarzeniowy Matting type
1	US-8	1994	1.2.3.4.5.6.7.10.11	1,0	A2
2	MP 324	1997	1.2.3.4.5.6.7.8.10.11	1,5	A1
3	MP 423	1998	1.2.3.4.5.6.7.8.10.11	1,0	A2
4	MP 425	1999	1.2.3.4.5.6.7.10.11	1,0	A1

Inokulum sporządzono ze sporangów zebranych z 7-dniowych kultur *P. infestans* z plastrów ziemniaka oraz z wody dejonizowanej. Inokulum doprowadzono do koncentracji 50 i 200 sporangów w 1 mm³ i przetrzymywano przez 2 godziny w temperaturze 7°C aby rozpoczął się proces uwalniania pływek ze sporangów.

Stabilność ekspresji wirulencji we wszystkich terminach oceniano na listkach testerów Black'a zawierających pojedyncze geny odporności specyficznej (od R1 do R11), a poziom agresywności na listkach odmian Bintje i Tarpan nie posiadających genów odporności specyficznej. Zastosowano po 5 listków w każdej kombinacji. Listki ułożono na wilgotnej ligninie w kuwetach fotograficznych spodnią stroną ku górze i inokulowano umieszczając po dwie krople inokulum po obu stronach nerwu głównego. Po 24 godzinach inkubacji w 16°C i przy oświetleniu około 2000 luksów listki odwrócono i inkubowano dalej w tych samych warunkach. Ocenę przeprowadzono po sześciu dniach od inokulacji. Przy ocenie zakresu wirulencji przyjęto, że za pełną ekspresję czynnika wirulencji uznaje się wytworzenie się plam, na których tworzyło się zarodnikowanie patogena na przynajmniej trzech spośród pięciu badanych listków. Wartość tę określono jako 1. Przy braku porażenia lub porażeniu mniej niż 3 listków poszczególnych testerów przyjęto wartość 0.

Przy ocenie poziomu agresywności posługiwano się skalą 9-cio stopniową, w której 1 oznacza całkowite porażenie (Zarzycka, 2001).

Uzyskane wyniki porównano za pomocą trójczynnikowej analizy wariancji w oparciu o test Tukey'a.

WYNIKI I DYSKUSJA

Zastosowane w tej pracy warianty doświadczenia (terminy założenia doświadczenia, liczba pasaży *P. infestans* na tkankach ziemniaka oraz koncentracje sporangiów w inokulum) miały większy wpływ na zmienność wirulencji aniżeli agresywności. Tylko liczba pasaży miała istotny wpływ na różnice w agresywności izolatów *P. infestans*. Wyniki te są zgodne z pracami Thurstona (1957), Hodgsona i Sharma'y (1967) oraz Sujkowskiego (1983), w których izolaty traciły patogeniczność w czasie przechowywania na pożywkach. W naszych badaniach odzyskanie wyjściowego poziomu agresywności i wirulencji nastąpiło dopiero po przynajmniej dwukrotnym pasażu *P. infestans* na tkankach ziemniaka.

1. Stabilność wirulencji

Każdy z wariantów przeprowadzonego doświadczenia miał istotny wpływ na ekspresję wirulencji. Analiza wpływu terminu testu na ekspresję wirulencji wykazała, że jedynie w terminie grudniowym wystąpiła istotna różnica w ekspresji czynników wirulencji v w stosunku do terminu wrześniowego testu. Pozostałe terminy nie różniły się od siebie istotnie pod względem zakresu wirulencji (Tabela 2). Istotnie silniejszą ogólną ekspresję czynników wirulencji stwierdzono po zastosowaniu inokulum o koncentracji 200 sporangiów w 1 mm^3 w porównaniu do inokulum o koncentracji 50 sporangiów, co okazało się zgodne z wynikami uzyskanymi przez Pietkiewicza (1976a) i Zarzycką (1989). Wielokrotne przeszczepianie kultur na tkankach ziemniaka przed użyciem ich do inokulacji dało istotnie lepsze wyniki niż dwukrotne, aczkolwiek istotnie najmniejszy zakres czynników wirulencji obserwowano w kombinacji z jednorazowym pasażowaniem kultur na plastrach bulw. Potwierdziły to dane uzyskane przez Zarzycką (1995) oraz wcześniejsze, wstępne wyniki otrzymane przez Sobkowiaka i in. (2001).

Pomimo że w tej pracy badano zaledwie cztery izolaty *P. infestans* to obliczony błąd doświadczenia okazał się stosunkowo niski i wynosił od 3,6% (dla wariantu: koncentracje inokulum) do 9,7% (dla interakcji: terminy oceny w kombinacji z liczbą pasaży). Wskazywałoby to na dużą powtarzalność wśród izolatów w danej kombinacji w osiągnięciu przez nich odpowiedniego spektrum wirulencji.

W omawianym doświadczeniu zwrócono szczególną uwagę na możliwość wystąpienia interakcji pomiędzy poszczególnymi wariantami doświadczenia. Analiza wariancji ujawniła istotność ekspresji wirulencji wśród efektów głównych tj. najwyższą dla liczby pasaży i koncentracji inokulum przy poziomie istotności $\alpha=0,01$ oraz w mniejszym stopniu dla terminu testu – przy $\alpha=0,05$ (Tabela 3). Istotny rezultat w układzie interakcji stwierdzono w kombinacjach obejmujących terminy testu i liczbę pasaży przy poziomie istotności $\alpha=0,01$ oraz w kombinacjach obejmujących terminy testu i koncentracje inokulum przy poziomie istotności $\alpha=0,05$. Stwierdzono jednak brak zróżnicowania w ekspresji wirulencji między marcem, czerwcem, wrześniem a grudniem dla wariantu wielokrotnego pasażowania. Podobna sytuacja została odnotowana w wariancie dwukrotnego pasażowania izolatów przed inokulacją. Natomiast istotnie słabszą wirulencję stwierdzono w czerwcu i grudniu w porównaniu do marca i września w wariancie jednokrotnego pasażowania (Tabela 2).

Tabela 2

Wpływ terminu oceny, liczby pasaży oraz koncentracji inokulum na ekspresję wirulencji izolatów *Phytophthora infestans*

Table 2

The effect of assessment date, inoculum concentration and number of passages on virulence expression of *Phytophthora infestans* isolates

Terminy oceny Assessment date	Koncentracje inokulum Inoculum concentrations	Liczba czynników wirulencji Number of virulence factors																Średnia dla terminów Mean value for dates	
		Izolaty Isolates												Interakcja terminy x pasaże Dates x passages interaction			Interakcja: terminy x koncentracje Dates x concentrations interaction		
		US-8			MP 324			MP 423			MP 425								
		1p ¹⁾	2p ²⁾	w ³⁾	1p	2p	w	1p	2p	w	1p	2p	w	1p	2p	w	1p		2p
marzec March	50	8	8	8	4	8	9	3	8	8	8	9	8	5,7 b ⁴⁾	8,0 b	8,7 a	7,5 m	7,6 m	7,5 kl
	200	0	8	8	5	8	10	8	9	9	9	9	9						
czerwiec June	50	0	7	9	2	7	9	2	9	8	8	8	9	3,9 c	8,4 ab	8,9 a	6,5 no	7,7 m	7,1 kl
	200	1	9	9	6	9	9	3	9	9	9	9	9						
wrzesień September	50	6	8	8	8	8	8	5	9	8	9	9	9	6,7 b	8,0 b	8,6 ab	7,4 nm	7,8 m	7,8 k
	200	4	8	8	5	9	9	7	9	9	9	9	9						
grudzień December	50	0	4	8	9	8	8	0	8	8	8	8	8	4,2 c	7,9 b	8,7 a	6,3 o	7,5 m	6,9 l
	200	0	9	9	8	9	10	0	9	9	8	9	9						
		Średnia dla pasaży Mean value for passages												5,1 z	8,1 y	8,7 x			
	50	Interakcja pasaże x koncentracje Passages x concentrations interaction												5,0 i	7,6 i	8,4 i			
	200													5,2 i	8,6 i	9,0 i			
		Średnia dla koncentracji Mean value for concentration															7,0 β	7,6 α	

¹⁾ 1p = pojedynczy pasaż na plastrach z bulw ziemniaka Single passage on potato tuber slices²⁾ 2p = podwójny pasaż na plastrach z bulw ziemniaka Double passage on potato tuber slices³⁾ w = kultury wielokrotnie pasażowane na plastrach z bulw ziemniaka Cultures many times passaged on potato tuber slices⁴⁾ Wartości oznaczone różnymi literami różnią się od siebie istotnie według testu Tukey'a przy P=0,05 The values marked with the various letters differ significantly according to Tukey's test for P=0,05

Tabela 3

Analiza wariancji zmienności wirulencji izolatów *P. infestans* w odniesieniu do zastosowanych izolatów, terminów oceny, liczby pasażów oraz koncentracji inokulum

Table 3

Analysis of variance of virulence in *P. infestans* isolates after used the experiment date, number of passages and inoculum concentration

Źródło zmienności Source of variation	Liczba stopni swobody Degrees of freedom	Średni kwadrat Mean square	F obliczone Value F
Izolaty x listki = powtórzenia Isolates x leaves = replication	19	621,494	6,681 **
Termin doświadczenia (czynnik A) Date of experiment (A factor)	3	333,852	3,589 *
Liczba pasażów (czynnik B) Number of passages (B factor)	2	16576,809	178,197 **
Koncentracje inokulum (czynnik C) Inoculum concentrations (C factor)	1	1696,557	18,238 **
Interakcja A x B ; A x B interaction	6	792,225	8,516 **
Interakcja A x C ; A x C interaction	3	284,506	3,058 *
Interakcja B x C ; B x C interaction	2	145,953	1,569 ns
Interakcja A x B x C ; A x B x C interaction	6	151,831	1,632 ns
Błąd; Error	437	93,025	

*, ** – istotność odpowiednio przy $\alpha=0,05$ oraz przy $\alpha=0,01$ – significant at $\alpha=0.05$ and $\alpha=0.01$ respectively

ns – brak istotności – not significant

Stwierdzono brak istotnego różnicowania ekspresji wirulencji przy zwiększonej koncentracji inokulum 200 sporangiów w 1 mm³ w kombinacji z poszczególnymi terminami oceny. Natomiast przy obniżonej koncentracji inokulum 50 sporangiów w 1 mm³ wykazano w marcu istotnie większą frekwencję czynników wirulencji w porównaniu do czerwca i grudnia. Termin wrześniowy był istotnie lepszy, ale tylko w stosunku do grudnia przy tej koncentracji inokulum.

Poszczególne izolaty wykazywały dużą zmienność ekspresji wirulencji w poszczególnych terminach oceny, ale największą stabilnością wykazał się MP 425. Izolat ten osiągnął ustabilizowaną, wysoką, 8-9 czynnikową wirulencję już po jednorazowym jego przepasażowaniu przez tkanki ziemniaka nawet w kombinacji o niższej koncentracji inokulum. Ten izolat nadaje się do oceny odporności materiałów hodowlanych, gdyż osiągał ustabilizowaną wysoką frekwencję czynników wirulencji już po jednorazowym pasażu. Pozostałe trzy izolaty mogą być użyte do testowania materiałów hodowlanych tylko po uprzednim, co najmniej dwukrotnym, pasażowaniu ich przez tkanki ziemniaka. Największą zmiennością odznaczały się izolaty US-8 i MP 423, gdyż ekspresja ich wirulencji wahała się od 0 (po jednorazowym pasażu) do 9 czynników w wyniku dwu- oraz wielokrotnego pasażu. Izolaty US-8, MP 324 i MP

423 w zasadzie odzyskały prawie pełną ekspresję wirulencji po dwukrotnym pasażu w kombinacji o zwiększonej koncentracji inokulum, a pełną ekspresję (w przypadku US-8 i MP 324), porównywalną z wynikami badań początkowych dopiero po wielokrotnym pasażu. Przyczyny utraty właściwości pasożytniczych izolatów można przypisywać przechowywaniu ich od czasu izolacji na sztucznych podłożach i przystosowaniu się do saprofitycznego trybu życia, oraz ogólnemu osłabieniu spowodowanemu niepełnym zestawem składników odżywczych w pożywce, niezbędnych dla *P. infestans*. Te obniżone właściwości mogą zostać odzyskane poprzez przeszczepienie kultur *P. infestans* z pożywki na tkanki ziemniaka (Sujkowski, 1983). W naszych badaniach stwierdziliśmy, że jednorazowe, a nawet dwukrotne pasażowanie kultur na tkanki ziemniaka może nie wystarczać do tego, aby kultury te odzyskały pełną ekspresję wirulencji i agresywności. Być może lepszy rezultat zostałby uzyskany po trzy- lub czterokrotnym zabiegu przeszczepiania kultur na tkanki ziemniaka. Jinks i Grindle (1963) stwierdzili, że spadek patogeniczności był odwracalny jeśli utrzymywanie kultur na sztucznym podłożu nie trwało dłużej aniżeli jeden rok. Jeśli przechowywanie izolatów na pożywce trwało dłużej wówczas ulegały one zmianom nieodwracalnym.

Badane izolaty *P. infestans* reagowały w różny sposób na zwiększoną koncentrację sporangiów w inokulum. W większości przypadków w wyniku inokulacji listków, inokulum o większej koncentracji powodowało taką samą lub większą wykrywalność czynników wirulencji w porównaniu z inokulum o niższej koncentracji. Jednak w przypadku izolatów US-8 i MP 324 po pasażu jednorazowym obserwowano zjawisko odwrotne – wyższa koncentracja powodowała spadek ekspresji wirulencji. Prawdopodobnie patogen, który po jednorazowym pasażu nie odzyskał jeszcze w pełni swoich właściwości pasożytniczych, przy wyższej koncentracji sporangiów, silnie zareagował na pogarszające się warunki tlenowe zahamowaniem uwalniania się pływek ze sporangiów, co wyraźnie pogorszyło infekcyjność inokulum o wyższej koncentracji. Takie zjawiska obserwowali w swoich badaniach Pietkiewicz (1976b) i Zarzycka (1989).

Wydaje się konieczne, żeby przed przeznaczeniem do badań izolatu w testach masowych, przebadać go pod kątem ilości pasaży przez tkanki ziemniaka niezbędnych do osiągnięcia wysokiej i stabilnej ekspresji czynników wirulencji.

2. Frekwencja poszczególnych czynników wirulencji

Wszystkie zastosowane warianty metodyczne miały pewien wpływ na ekspresję poszczególnych czynników wirulencji (Tabela 4). Wysoką ekspresję odnotowano dla czynników v1, v2, v4, v6 i v7, których frekwencja w testach w poszczególnych terminach wahała się od 0,8 do 1,0. Bardziej zmiennie zareagowały czynniki v3, v10 i v11, wykazując wahania ekspresji od 0,70 do 0,91.

Czynniki v5 i v8 miały słabą i bardzo zmienną ekspresję w testach. Frekwencja v5 wahała się od 0,16 do 0,56, a v8 od 0,00 do 0,32 w zależności od miesiąca oceny.

Tabela 4

Wpływ terminu oceny, liczby pasaży oraz koncentracji inokulum na frekwencję poszczególnych czynników wirulencji *P. infestans*

Table 4

The effect of assessment date, inoculum concentration and number of passages on frequency of particular virulence factors

Czynniki wirulencji Virulence factors	Frekwencja czynników wirulencji												Frequency of virulence factors																							
	Wpływ: terminy x pasaże Effect of dates x passages												Wpływ: koncentracje x terminy Effect of concentrations x dates												Wpływ: pasaże x koncentracje Effect of passages x concentrations						Wartości średnie Mean values					
	marzec (III) March			czerwiec (VI) June			wrzesień (IX) September			grudzień (XII) December			Koncentracja inokulum 50 inoculum concentration 50				koncentracja inokulum 200 inoculum concentration 200				1 pasaż 1 passage		2 pasaże 2 passages		w		dla terminów for dates				dla koncentracji for concentrations		dla pasaży for passages			
	1p ¹⁾	2p ²⁾	w ³⁾	1p	2p	w	1p	2p	w	1p	2p	w	III	VI	IX	XII	III	VI	IX	XII	50 ⁴⁾	200 ⁵⁾	50	200	50	200	50	200	III	VI	IX	XII	50	200	1p	2p
v1	0,60	0,97	1,00	0,60	0,97	1,00	0,67	0,92	1,00	0,60	0,95	1,00	0,85	0,78	0,85	0,83	0,87	0,85	0,88	0,87	0,56	0,63	0,93	0,98	1,00	1,00	0,86	0,86	0,86	0,85	0,83	0,87	0,60	0,96	1,00	
v2	0,82	1,00	1,00	0,50	0,95	1,00	1,00	1,00	1,00	0,57	0,97	0,97	0,98	0,78	1,00	0,82	0,90	0,90	1,00	0,87	0,71	0,75	0,99	1,00	0,99	1,00	0,94	0,82	1,00	0,84	0,89	0,92	0,73	1,00	1,00	
v3	0,82	0,92	1,00	0,42	0,92	1,00	0,77	0,97	1,00	0,52	0,87	0,97	0,93	0,77	0,97	0,75	0,90	0,85	0,87	0,83	0,64	0,64	0,90	0,95	0,99	1,00	0,91	0,78	0,91	0,79	0,85	0,86	0,64	0,93	1,00	
v4	0,60	0,95	1,00	0,67	0,97	1,00	1,00	1,00	1,00	0,50	0,92	0,97	0,83	0,85	1,00	0,80	0,87	0,92	1,00	0,80	0,68	0,71	0,94	0,99	1,00	0,99	0,85	0,88	1,00	0,80	0,87	0,90	0,70	0,97	1,00	
v5	0,12	0,25	0,65	0,25	0,57	0,87	0,17	0,35	0,37	0,07	0,15	0,27	0,27	0,35	0,27	0,03	0,42	0,78	0,43	0,35	0,10	0,21	0,16	0,54	0,35	0,74	0,34	0,56	0,30	0,16	0,23	0,49	0,16	0,35	0,55	
v6	0,77	1,00	1,00	0,45	0,97	1,00	0,97	0,97	0,97	0,55	0,95	1,00	0,93	0,78	0,95	0,80	0,92	0,83	1,00	0,87	0,65	0,73	0,96	0,99	0,99	1,00	0,92	0,81	0,97	0,83	0,86	0,90	0,69	0,98	1,00	
v7	0,90	1,00	1,00	0,57	1,00	1,00	0,82	1,00	1,00	0,50	0,80	1,00	1,00	0,85	0,93	0,72	0,93	0,87	0,95	0,82	0,71	0,69	0,91	0,99	1,00	1,00	0,97	0,86	0,94	0,80	0,87	0,89	0,70	0,95	1,00	
v8	0,02	0,05	0,20	0,10	0,12	0,07	0,00	0,00	0,00	0,20	0,05	0,70	0,05	0,07	0,00	0,15	0,13	0,13	0,00	0,42	0,08	0,09	0,04	0,08	0,09	0,35	0,09	0,10	0,00	0,32	0,21	0,42	0,09	0,06	0,22	
v9	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,10	0,02	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,08	0,00	0,00	0,00	0,05	0,00	0,01	0,00	0,00	0,00	0,04	0,00	0,02	0,00	0,03	0,01	
v10	0,47	0,80	1,00	0,20	0,95	0,97	0,37	0,77	0,97	0,50	0,87	1,00	0,78	0,65	0,68	0,77	0,73	0,80	0,73	0,82	0,39	0,41	0,80	0,90	0,98	1,00	0,76	0,71	0,70	0,79	0,72	0,77	0,40	0,85	0,99	
v11	0,52	0,92	1,00	0,35	0,87	1,00	0,67	0,90	0,95	0,52	0,90	1,00	0,80	0,73	0,78	0,78	0,83	0,75	0,90	0,83	0,54	0,50	0,81	0,99	0,98	1,00	0,81	0,74	0,84	0,81	0,77	0,83	0,52	0,90	0,99	

¹⁾ 1p = pojedynczy pasaż na plasterach z bulw ziemniaka Single passage on potato tuber slices²⁾ 2p = podwójny pasaż na plasterach z bulw ziemniaka Double passage on potato tuber slices³⁾ w = kultury wielokrotnie pasażowane na plasterach z bulw ziemniaka Cultures many times passaged on potato tuber slices⁴⁾ 50 = koncentracja inokulum 50 sporangiów w 1mm³ Inoculum concentration 50 sporangia in 1 mm³⁵⁾ 200 = koncentracja inokulum 200 sporangiów w 1mm³ Inoculum concentration 200 sporangia in 1 mm³

Czynnik v9, którego obecności nie stwierdzono w badaniach wstępnych ocenianych izolatów, wystąpił sporadycznie w teście grudniowym przy podniesionej koncentracji inokulum (200 sporangiów w 1 mm³) i dwu- (w US-8) lub wielokrotnych (w MP 324) pasażach.

Najslabszą wykrywalność obserwowano w czerwcu i grudniu. W tych terminach stwierdzono słabszą ekspresję tych czynników wirulencji, które uważane są za bardzo lub średnio stabilne tj. v2, v3, v4, v6, v7 (Zar z y c k a i in., 2002). Czynnik v1 reagował dosyć jednolicie we wszystkich terminach z frekwencją 0,85-0,86. Najwyższą ekspresję w marcu i wrześniu wykazywały czynniki v2, v3, v6 i v7, a w czerwcu i wrześniu czynnik v4. Bardzo zmienny czynnik v5 był najlepiej wykrywalny w czerwcu.

Uszeregowanie poszczególnych czynników wirulencji pod względem częstotliwości występowania było bardzo podobne we wszystkich terminach, w których zostały przeprowadzone testy. Współczynniki korelacji między poszczególnymi terminami w tym przypadku wahały się od $r=0,878^{**}$ (między marcem a czerwcem) do $r=0,999^{**}$ (między wrześniem a grudniem).

Zwiększenie koncentracji sporangiów w inokulum miało pewien wpływ na lepszą wykrywalność wszystkich czynników wirulencji, choć na ogół wpływ ten nie był znaczny w przypadku czynników charakteryzujących się dużą lub średnią stabilnością frekwencji. Wyraźnie większą ekspresję wykazały czynniki bardzo zmienne, a czynnik v9 został wykryty tylko w kombinacji, w której zastosowano wyższą koncentrację sporangiów.

Liczba pasaży, które wykonano na tkankach ziemniaka miała też duży wpływ na wykrywalność poszczególnych czynników wirulencji. Znacznie wyższą zaobserwowano w kulturach dwukrotnie pasażowanych w porównaniu z kulturami pasażowanymi tylko raz. Natomiast różnice pomiędzy pasażem podwójnym a wielokrotnym były dużo mniejsze niż między pasażem pojedynczym a podwójnym. Obserwacja ta dotyczyła czynników bardzo lub średnio stabilnych. Czynniki bardzo zmienne v5 i v8 charakteryzowały się znacznie wyższą ekspresją wirulencji w kombinacji kontrolnej (wielokrotnie pasażowanej) niż po dwóch przeszczepieniach, a czynnik v9 wcale nie został wykryty w kombinacji jednorazowo przeszczepionej. Wykrywalność czynników wirulencji w kombinacji wielokrotnego pasażowania, z wyjątkiem czynników bardzo zmiennych v5, v8 i v9 była prawie stuprocentowa.

3. Stabilność agresywności

W przeprowadzonym doświadczeniu tylko liczba przeszczepień badanych kultur na plastrach z bulw ziemniaka, wykonanych przed inokulacją miała istotny wpływ na ekspresję agresywności. Wyższy poziom agresywności stwierdzono po wielokrotnym i dwukrotnym pasażu niż po pasażu jednorazowym. Natomiast termin wykonania testu i koncentracja inokulum nie miały wpływu na poziom agresywności (Tabela 5). Nie zaobserwowano również istotnego współdziałania pomiędzy poszczególnymi wariantami doświadczenia.

Tabela 5

Wpływ terminu oceny, liczby pasaży oraz koncentracji inokulum na ekspresję agresywności izolatów *Phytophthora infestans*

Table 5

The effect of assessment date, inoculum concentration and number of passages on aggressiveness expression of *Phytophthora infestans* isolates

Terminy oceny Assessment dates	Koncentracje inokulum Inoculum concentrations	Stopień porażenia Degree of infection																	
		Izolaty Isolates												Interakcja terminy x pasaż Dates x passages interaction			Interakcja: terminy x koncentracje Dates x concentrations interaction		Średnia dla terminów Mean value for dates
		US-8			MP 324			MP 423			MP 425								
		1p ¹⁾	2p ²⁾	w ³⁾	1p	2p	w	1p	2p	w	1p	2p	w	1p	2p	w	50	200	
marzec March	50	3,5	2,1	1,7	7,0	1,7	1,1	6,7	4,4	1,6	1,1	1,3	1,3	4,6 a	2,2 a	1,3 a	2,8 m	2,6 m	
	200	8,7	1,9	1,1	6,0	2,1	1,2	2,9	3,0	1,1	1,1	1,3	1,2						
czerwiec June	50	8,4	6,4	1,0	6,6	3,3	1,0	7,3	1,3	1,4	2,3	2,5	2,0	5,8 a	2,4 a	1,6 a	3,6 m	2,9 m	3,3 k
	200	8,6	1,4	1,4	5,4	1,6	1,1	6,1	1,3	2,3	2,1	1,2	2,3						
wrzesień September	50	5,7	5,2	1,9	4,2	2,2	2,1	5,0	4,8	2,5	2,5	1,4	2,4	4,4 a	3,4 a	2,3 a	3,3 m	3,5 m	3,4 k
	200	6,6	4,7	2,5	4,0	2,2	2,5	4,8	4,7	2,3	2,7	2,0	2,5						
grudzień December	50	6,9	5,1	3,0	3,2	3,6	3,1	9,0	4,5	3,6	3,1	3,2	3,0	5,6 a	3,8 a	2,9 a	4,3 m	3,9 m	4,1 k
	200	8,2	3,9	2,5	2,9	3,7	2,3	8,9	3,9	2,7	2,7	2,7	3,0						
		Średnia dla pasaży Mean value for passages												5,1 v ³⁾	2,9 x	2,0 x			
	50	Interakcja pasaże x koncentracje												5,2 i	3,3 i	2,0 i			
	200	Passages x concentrations interaction												5,1 i	2,6 i	2,0 i			
		Średnia dla koncentracji Mean value for concentration															3,5 α	3,2 α	

¹⁾ 1p = pojedynczy pasaż na plasterach z bulw ziemniaka Single passage on potato tuber slices²⁾ 2p = podwójny pasaż na plasterach z bulw ziemniaka Double passage on potato tuber slices³⁾ w = kultury wielokrotnie pasażowane na plasterach z bulw ziemniaka Cultures many times passaged on potato tuber slices⁴⁾ Wartości oznaczone różnymi literami różnią się od siebie istotnie według testu Tukey'a przy P=0,05 The values marked with the various letters differ significantly according to Tukey's test for P=0.05

Podobnie jak przy omawianiu wirulencji, izolat MP 425 we wszystkich terminach oceny w kombinacji z dwoma koncentracjami inokulum, już po pierwszym pasażu wykazał się wysoką i ustabilizowaną agresywnością. Ekspresja agresywności tego izolatu po jednorazowym przeszczepieniu na plastry ziemniaka była zbliżona do ekspresji uzyskanej po dwu- i wielokrotnym pasażowaniu. Izolat MP 425 będzie prawdopodobnie użyty do testowania odporności materiałów hodowlanych na zarazę w związku z nagłym załamaniem się stabilnej, wysokiej patogeniczności dotychczas używanego izolatu MP 324.

Utrata właściwości pasożytniczych izolatów *P. infestans* w czasie przechowywania na podłożach sztucznych znana była z doniesień Jinka i Grindle'a (1963). Prezentowane wyniki wykazały, że najlepszą ekspresję agresywności stwierdzono w kombinacjach z dwukrotnym oraz wielokrotnym pasażowaniem *P. infestans* na tkankach ziemniaka. Wyniki te zgadzają się z wynikami wcześniejszych badań Zarzyckiej (1995 i 1996). Pomimo że izolaty utrzymywane (wielokrotnie pasażowane) na tkankach ziemniaka charakteryzują się wysoką oraz ustabilizowaną patogenicznością, to jednak nie jest wskazane przechowywanie ich w tej formie, gdyż byłoby to zbyt pracochłonne i kłopotliwe ze względu na konieczność stałego zabezpieczenia świeżego materiału roślinnego ziemniaka niezbędnego do cotygodniowych przeszczepień (Świszczewska i in., 1971; Zarzycka, 1995 i 1996). Wśród izolatów, które były wielokrotnie (przez wiele miesięcy) pasażowane na tkankach roślinnych zdarzały się także nieprzewidywalne załamywania się ekspresji agresywności i wirulencji. Według Pietkiewicza (1978) izolaty pasażowane przez dwa lata na plastrach ziemniaka po tym okresie traciły 50% agresywności w stosunku do odpornych odmian ziemniaka. Podobne wyniki osiągnięto w doświadczeniu przeprowadzonym w Młochowie, w którym przez kilka miesięcy trenowano izolaty *P. infestans* na zranionych za pomocą papieru ściernego listkach krańcowo odpornego testera Black'a R9 (Świeżyński i wsp. 1996). Na początku badań, na uszkodzonych listkach testera Black'a R9 rozwinęły się objawy chorobowe w postaci plam, na których wytworzyło się zarodnikowanie patogena. Z czasem jednak patogeniczność izolatów w stosunku do testera R9 uległa całkowitemu załamaniu.

LITERATURA

- Hodgson W. A., Sharma K. P., 1967. Restoration of virulence of stored cultures of *Phytophthora infestans*. Can. J. Plant Sci. 47: 447-449.
- Jinks J. L., Grindle M., 1963. Changes induced by training in *Phytophthora infestans*. Heredity 18, 3: 254-264.
- Pietkiewicz J., 1976a. Charakterystyka odporności poziomej ziemniaka na zarazę *Phytophthora infestans* (Mont.) de Bary. Rozpr. hab. Inst. Ziemn., Bonin.
- Pietkiewicz J., 1976b. Metody badań w pracach nad zarazą ziemniaka. Z prac Inst. Ziem. 6/7: 31-39.

- Pietkiewicz J., 1978. Stability of *Phytophthora infestans* (Mont.) de Bary races in culture. Protection Ecology 1: 55-62.
- Sobkowiak S., Zarzycka H., Lebecka R., Zimnoch-Guzowska E., 2001. Wpływ terminów oceny na zmienność wirulencji i agresywności wybranych izolatów *Phytophthora infestans*. Mat. z. Konf. „Ochrona Ziemiaka”, Kołobrzeg, 19-20.04.2001 r.: 144-149.
- Sujkowski L. S., 1983. Zmienność własności pasożytniczych grzyba *Phytophthora infestans* (Mont.) de Bary w stosunku do ziemniaka w cyklu rocznym. Praca doktorska, Młochów: ss. 63.
- Świeżyński K. M., Domański L., Sobkowiak S., Zarzycka H., 1996. Reaction to *Phytophthora infestans* of potato genotypes with race-specific resistance. Potato Res. 39: 195-203.
- Świszczewska J., Osińska M., Piotrowski W., 1971. Patogenicność ras zarazy ziemniaczanej (*Phytophthora infestans* Mont de Bary) w zależności od biotypu, podłoża i pory roku. Biul. Inst. Ziemn., 8: 21-37.
- Thurston H. D., 1957. The culture of *Phytophthora infestans*. Phytopathology 47, 3: 186.
- Zarzycka H., 1995. Effect of culturing *Phytophthora infestans* on various substrates on expression of its virulence and aggressiveness to potato. Phytopath. Polonica 9 (XXI): 81-88.
- Zarzycka H., 1996. Effect of various methods of maintenance of *Phytophthora infestans* on its pathogenicity to potato. Plant Breed. and Seed Sc., V. 40, no 1/2: 31-43.
- Zarzycka H., 1989. Wpływ stężenia i rodzaju inokulum na reakcje odpornościowe ziemniaka na *Phytophthora infestans*. Zesz. Probl. Post. Nauk Roln. 374: 415-424.
- Zarzycka H., 2001. Izolacja, utrzymywanie i przechowywanie izolatów *Phytophthora infestans*. Monogr. i Rozpr. Nauk., IHAR 10/2001: 62-64.
- Zarzycka H., Sobkowiak S., Lebecka R., Tatarowska B., 2002. Kształtowanie się fenotypowej struktury populacji *Phytophthora infestans* w Polsce w ciągu 15-lecia 1987-2001. Acta Agrobotanica 55, 1: 389-400.

Wpływ różnych metod traktowania kultur na ekspresję wirulencji i agresywności *Phytophthora infestans*

Streszczenie

Zbadano w czterech testach wpływ terminu przeprowadzenia doświadczenia, koncentracji inokulum i liczby wykonanych pasażów na spektrum wirulencji i poziomu agresywności czterech wybranych izolatów *P. infestans*. Wszystkie wymienione powyżej warianty doświadczenia miały wpływ na ekspresję wirulencji. Zakres wirulencji zanotowany w czerwcu i grudniu okazał się największy w porównaniu z zakresami obserwowanymi we wrześniu i marcu. Koncentracja inokulum wynosząca 200 sporangiów w 1 mm³ wpływała korzystniej na frekwencję czynników wirulencji niż koncentracja 50 sporangiów w 1 mm³. Kultury pasażowane wielokrotnie wykazały szerszy zakres wirulencji niż pasażowane jednokrotnie i dwukrotnie. Dwukrotny pasaż kultur *P. infestans* przed inokulacją wpłynął korzystniej na ekspresję wirulencji

niż pasaż jednorazowy. Obserwowano istotną interakcję pomiędzy terminami testów i liczbą pasaży oraz pomiędzy terminami i zmniejszoną koncentracją inokulum. Większa koncentracja inokulum i liczniejsze pasáže na tkankach ziemniaka wpływały pozytywnie na wykrywalność poszczególnych czynników wirulencji, zwłaszcza v5 i v8.

Kultury dwukrotnie i wielokrotnie pasażowane na plastrach z bulw ziemniaka były istotnie bardziej agresywne w porównaniu z kulturami pasażowanymi tylko raz. Izolat MP 425 miał najbardziej stabilną ekspresję wirulencji i agresywności. Kultury *P. infestans*, które utraciły infekcyjność wskutek przechowywania na żytym agarze mogą odzyskać swoją wirulencję i agresywność po wielokrotnym pasażowaniu na tkankach ziemniaka.